



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

보건학석사학위논문

한국에서 분리된 *Cryptococcus neoformans*

임상균주의 분자역학적 연구

Molecular Epidemiology of Clinical Strains of
Cryptococcus neoformans Isolated from Korea

2013년 8월

서울대학교 보건대학원

보건학과 역학전공

박 소 혜

한국에서 분리된 *Cryptococcus neoformans*

임상균주의 분자역학적 연구

Molecular Epidemiology of Clinical Strains of
Cryptococcus neoformans Isolated from Korea

지도교수 조 성 일

이 논문을 보건학 석사학위 논문으로 제출함

2013년 4월

서울대학교 보건대학원

보건학과 역학전공

박 소 혜

박소혜의 석사학위논문을 인준함

2013년 7월

위 원 장 이 승 욱 (인)

부위원장 고 광 표 (인)

위 원 조 성 일 (인)

국문초록

Cryptococcosis는 사람과 동물의 폐, 중추신경계 및 전신성 감염증으로 주로 *Cryptococcus neoformans* 균종에 의하여 유발된다. *C. neoformans*는 다당체 협막을 보유한 basidiomycetes 효모양 진균으로 기회적 감염을 일으키며 특히 면역기능저하 환자에 흔히 감염되지만, 선행질환이 없는 환자도 감염될 수 있다. *C. neoformans*는 생물학적 특성과 분자유전학적 특성의 차이에 의하여 여러 종류의 혈청형과 유전자형이 존재하며 전세계 지역에 따라 그 분포가 다르다.

본 연구에서는 2008년에서 2010년 사이에 서울 및 부산지역 일부 종합병원의 환자에서 분리된 *C. neoformans* 30균주의 분자생물학적 특성을 분석하였고, 또한 *C. neoformans* 균이 분리된 환자들의 임상적 특성으로 성별, 평균나이 및 기저질환과의 상관성을 기존의 연구와 비교한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

총 30명의 환자에서 분리된 *C. neoformans*는 협막항원의 차이에 따른 혈청형검사서 모두 혈청형 A로 확인되었으며, mating type은 모두 MATa이었다. M13 phage의 microsatellite 특이 염기서열 primer을 이용한 PCR-fingerprinting, URA5 유전자 restriction fragment length poly-

moorphism (RFLP) 분석 및 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석에서 30균주 모두는 *C. neoformans* var. *grubii* 유전자형 VNI형으로 확인되었으며 균종간의 차이가 없음을 확인하였다.

역학적 특성으로 2008년부터 2010년 사이 *C. neoformans* 가 분리된 환자 총 30명에서 2009년에 분리율이 17명(56.7%)으로 상대적으로 높았으며, 평균연령은 62.7세이었다. 총 30명 중 여성이 17명(56.7%)이었고 연도별 성비는 지속적으로 상승하였다. 총 30명의 환자 중 기저질환이 존재한 환자는 24명(80%)이었으며 기저질환 중 간세포암이 5명(20.8%)으로 가장 많았으며 그 다음으로 폐암과 HIV감염이 각각 3명(12.5%)이었다. 이와 같은 결과는 2008년까지의 기존의 연구에서 Cryptococcosis 환자들이 여성보다 남성 많다는 결과와 다른 양상을 보여주고 있으며, 평균연령 51.7세에서 59.1세의 연구결과에 비하여 62.7세로 고령화에 따른 영향을 나타내고 있다. HIV 감염을 제외한 기저질환과의 상관성에서도 악성질환이 우위를 차지하고 있으며 특히 간세포암에서 분리율이 높음을 확인하였다.

주요어: *Cryptococcus neoformans*, 유전자형, 분자역학, 기저질환

학번 : 2011-22101

목 차

국문초록	i
List of Tables	v
List of Figures	v
 I. 서론	 1
 II. 연구방법	 4
1. 실험균주	4
2. 혈청형 및 변종확인시험.....	6
3. 균체 DNA 분리	7
4. Mating type 분석	8
5. Molecular type 분석	9
5.1. M13 phage microsatellite primer 분석	9
5.2. <i>URA5</i> 유전자-Restriction Fragment Length polymorphism (RFLP)분석	10
5.3. Random amplification of polymorphic DNA 분석.....	11
6. 자료분석 및 통계처리	11
 III 연구결과	 12
1. <i>Cryptococcus neoformans</i> 혈청형 및 Mating type 확인.....	12
2. Molecular type	12
3. RAPD 분석	14
4. Cryptococcosis 환자의 일반적 특성	16

5. 기저질환과의 상관성	17
IV. 고 찰	19
V. 결 론	26
참고문헌	28
Abstract	34

List of Tables

Table1. Characteristic <i>C.neoformans</i> isolates used in this study	5
Table2. List of primers used in this study	9
Table3. General characteristic of the patients with cryptococcosis	16
Table4. Incidence and female distribution of cryptococcosis during 2008–2010	16
Table5. Underlying conditions of the patients of cryptococcosis	18

List of Figures

Figure 1. PCR– fingerprint profiles amplified with the primer M13	13
Figure 2. <i>URA5</i> -RFLP profiles identified after double digestion with the restriction enzymes HhaI and SauI	14
Figure 3. RAPD profiles amplified with the primer OPH-02(A) and OPH-12(B)	15

I. 서 론

*Cryptococcus neoformans*는 협막을 보유한 효모양 진균으로 사람과 동물의 폐, 중추신경계 및 전신에 감염을 일으키며 면역기능 저하환자에 흔히 감염되지만 선행질환이 없는 환자에서도 감염될 수 있다. 장기이식, 항암치료, 후천성면역결핍증(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)등으로 인하여 면역기능저하 환자가 증가하면서 *Cryptococcus*에 의한 기회 감염 발생이 증가되고 있다 (1,2).

Cryptococcosis의 주요 원인균인 *Cryptococcus* species는 *C.neoformans*와 *C. gattii* 2종으로 분류되며. 이들 균종의 다당체 협막성분의 항원성과 생태학적 특성 차이에 의하여 *C. neoformans*는 변종 var. *grubii*(혈청형A)와 var. *neoformans*(혈청형D) 그리고 hybrid형 AD, *C. gattii*는 혈청형 B와 C형으로 나누어진다(3,4). 또한 분자유전학적 특성에 의하여 *C. neoformans*는 VNI-VNIV형, *C. gattii*는 VGI-VGIV형의 각각 4종류의 유전자형으로 분류된다(4,5). *C. neoformans* var. *grubii* 혈청형 A에는 유전자형 VNI 또는 VNII이 존재하며, 이 중에서 VNI 유전자형은 전세계적으로 널리 분포되어 있으며 특히 비둘기 배설물을 비롯하여 조류 분변에 오염된 토양 그리고 썩은 나무 등이 이 균종의 자연 서식처로 잘 알려져 있다(6). 이에 비교하여 *C. gattii* 혈청형 B 또는 C형은 오세아니아 지역을 중심으로 열대와 아열대 지역에서만

제한적으로 분리되며 자연 서식처는 오스트레일리아 원산 *Eucalyptus* 나무로 알려져 있으며, 일부 열대 지역을 제외하고 AIDS환자에서 *C. gattii*에 의한 감염증은 거의 없는 것으로 보고되었다(7-9). 그러나 최근 연구보고에 의하면 기후에 따른 제한적 분리 균종인 *C. gattii*가 온대지역인 캐나다 밴쿠버, 북아메리카 및 일부 아시아지역에서 분리되고 있으며, 지역에 따른 유전자형의 특성이 보고됨으로써 역학적 연구가 활발히 진행되고 있다(10-12). *Cryptococcus*의 인체감염은 자연환경에서 basidiospore를 흡입함으로써 감염되는 것으로 알려져 있으나 생태학적, 역학적 관련성은 여전히 의문으로 남아있다(1).

*C. neoformans*는 heterothallic basidiomycetes로 두 종류의 mating type이 존재하며 mating type 관련 유전자 좌위에 기능이 다른 대립형질 *alpha* (*MATa*)와 *a* (*MATa*)에 의하여 조절된다. 일반적으로 환경이나 임상검체에서 분리되는 *C. neoformans*의 mating type은 대부분이 *MATa*이며, 드물게 *MAT a/a*인 diploid균주도 분리된다(13,14).

*C. neoformans*균종에 관한 분자역학적인 연구방법으로는 M13 phage의 microsatellite 특이염기서열(M13 primer)과, (GACA)₄ 또는 (GTG)₅ 반복서열을 이용한 PCR fingerprint분석법, orotidine monophosphosphate pyrophosphorylase (*URA5*) 유전자의 restriction fragment length poly-

morphism (RFLP)분석법, random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석법, amplified fragment length polymorphisms (AFLP), rDNA intergenic space regions(IGS) I과 II분석, multi-locus sequence typing (MLST)등이 이용되고 있으며, 이들 분석법에 의하여 8종류의 유전자형이 알려져 있다 (4,5,15). 우리나라에서는 *Cryptococcus* 균종의 분리율이 저조하며, 2008년 이후 이 균종에 관한 분자역학적 연구가 없는 실정이다. 또한 인구의 노령화, 항암제 치료등 면역기능저하 인구의 증가는 기회 감염의 주 원인 진균인 *Cryptococcus* 균 감염에 대한 진단, 치료 및 예방에 미치는 요인에 관하여 지속적 연구가 요구된다.

본 연구에서는 2008년에서 2010년 사이에 서울과 부산지역의 종합병원 임상검체에서 분리된 *C. neoformans* 균주의 혈청형, mating type, M13 primer PCR-fingerprinting, *URA5*-RFLP 그리고 2종류의 random primer를 이용한 RAPD법에 의한 균종의 특성을 분석하였고, 임상균주가 분리된 환자들의 역학적 자료로서 기저질환과의 상관성, 연령, 성비에 따른 차이점을 기존의 연구 결과와 비교하여 감염역학의 기초자료를 얻고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험균주

서울 및 부산지역 종합병원 2곳에서 2008년에서 2010년 사이 분리된 임상균주 총 30주를 사용하였다(Table 1). 여러 종류의 임상가검물에서 분리된 30균주는 각 병원 미생물검사실에서 *C. neoformans*로 동정된 균주로써, Sabouraud dextrose agar (SDA, BBL, Sparks, MD, USA)로 옮긴 다음 다시 재배양 한 후에 사용하였다. *C. neoformans*의 재 동정을 위하여 API 20C AUX system (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)을 이용한 당 동화시험과 Christensen's urea broth (Difco, Detroit, MI, USA)를 이용한 urease시험 양성인지를 확인하였고, 멜라닌 색소생성에 의한 갈색 집락을 확인하기 위하여 Staib's bird seed media (BSM)을 제조하여 사용하였다(16). 실험에 사용된 *C. neoformans*표준균주는 CBS 10085 (*C. neoformans* serotype A, VNI형), CBS 10084 (*C. neoformans* serotype A, VNII형), CBS10080 (*C. neoformans* serotype AD, VNIII형), CBS 10079(*C. neoformans* serotype D, VNIV형), 4종류를 사용하였다.

Table 1. Characteristics of *C. neoformans* isolates used in this study

No.	Strain	Gender	Age	Source	Underlying condition	Serotype	Mating type	Molecular type	Year	Location
1	sh98	M	58	Blood	None	A	α	VNI	2008	Seoul
2	sh99	F	75	Bronchial fluid	Leukemia	A	α	VNI	2008	Seoul
3	sh100	M	73	CSF ^a	AIDS	A	α	VNI	2008	Seoul
4	sh107	M	48	Tissue	Tuberculosis	A	α	VNI	2008	Seoul
5	sh108	M	62	Abdominal fluid	HCC ^b	A	α	VNI	2008	Seoul
6	sh109	M	35	CSF	AIDS	A	α	VNI	2009	Seoul
7	sh110	M	77	Pleural	Myocardial infarction	A	α	VNI	2009	Seoul
8	sh111	F	70	Bronchial fluid	Spinal stenosis	A	α	VNI	2009	Seoul
9	sh112	M	80	CSF	None	A	α	VNI	2009	Seoul
10	sh113	F	27	Blood	Herpes Zoster	A	α	VNI	2009	Seoul
11	sh114	F	70	Blood	None	A	α	VNI	2009	Seoul
12	sh115	F	68	Abdominal fluid	HCC	A	α	VNI	2009	Seoul
13	sh116	F	51	Tissue	Tuberculosis	A	α	VNI	2009	Seoul
14	sh117	M	57	Blood	Lymphoma	A	α	VNI	2009	Seoul
15	sh119	F	60	Urine	Endometrial cancer	A	α	VNI	2009	Seoul
16	sh120	F	68	Blood	Lung cancer	A	α	VNI	2009	Seoul
17	sh121	F	67	Bronchial fluid	Pancreatic carcinoma	A	α	VNI	2010	Seoul
18	sh122	F	65	Blood	HCC	A	α	VNI	2010	Seoul
19	sh123	F	63	Tissue	Lung cancer	A	α	VNI	2010	Seoul
20	sh124	F	61	Sputum	HCC	A	α	VNI	2010	Seoul
21	sh126	M	49	Blood	Lymphoma	A	α	VNI	2010	Seoul
22	sh127	M	66	Blood	Myocardial infarction	A	α	VNI	2010	Seoul
23	sh128	F	54	Ascitic fluid	Colon cancer	A	α	VNI	2010	Seoul
24	sh79	F	74	CSF	AIDS	A	α	VNI	2008	Seoul
25	sh102	F	68	Blood	Lung cancer	A	α	VNI	2009	Seoul
26	sh103	M	70	CSF	None	A	α	VNI	2009	Seoul
27	sh104	M	78	Sputum	unknown	A	α	VNI	2009	Busan
28	sh105	F	54	Blood	unknown	A	α	VNI	2009	Busan
29	sh106	F	77	Blood	PIT ^c	A	α	VNI	2009	Busan
30	sh118	M	55	Ascitic fluid	HCC	A	α	VNI	2009	Busan

^aCSF, cerebrospinal fluid ^bHCC, hepatocellular carcinoma

^cPIT, purpura idiopathic thrombocytopenia

2. 혈청형과 변종확인 시험

C. neoformans 변종 확인은 협막 다당체 성분의 항혈청을 이용한 혈청형 분석과 생화학적 반응 시험을 실시하여 결정하였다. 혈청형 분석은 *C. neoformans* 협막의 다당체 항원에 대한 항혈청을 이용한 slide agglutination test (Crypto Check Iatron RM 304-K kit; Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)를 실시하였다. 분리 균주들은 30℃에서 yeast extract malt extract agar(YMA, Difco, USA)에 배양하였고, 48시간 후에 McFarland scale pattern 2 (약 6×10^8 CFU/mL)에 맞춰 멸균식염수에 부유하였다. 응집반응을 보기 위한 글라스 슬라이드에 항혈청 5종 (F1, F5, F6, F7, F8)을 한 방울씩 먼저 떨어뜨린다. 각 항혈청 당 50 μ L의 *C. neoformans* 부유액을 떨어뜨려 혼합하였다. 혼합액이 균질화 될 수 있도록 2분간 교반하면서 슬라이드에서 작은 응집이 생기는 것을 직접 관찰하여 다음과 같이 판정하였다 : 혈청형 A는 F1과 F7에 응집, 혈청형 B는 F1과 F5에 응집, 혈청형 C는 , F1과 F6에 응집, 혈청형 D는, F1과 F8에 응집 그리고 혈청형 AD는 F1, F7, F8에 응집을 나타냄으로 각 검체의 결과를 확인하여 결정하였다. 변종확인 생화학적 검사는 Kwon-Chung법에 따라 canavanine-glycine bromthymol blue (CGB)를 제조하여 사용하였다(17). CGB배지에 함유된 glycine을 탄소원으로 이용할 수 있는 glycine decarboxylase의 생성유무를 관찰하는 것으로, 최종 동

정된 균주들을 CGB배지에 접종하고 30℃에서 24~48시간 배양한 다음, CGB 배지의 색깔이 원래 배지의 색깔인 녹황색에서 청색으로 색깔 변화를 보이면 양성, 색깔변화가 없거나 균이 자라지 않으면 음성으로 판정하였으며, glycine decarboxylase생성 균주인 *C. gattii* 는 양성반응, 이 효소를 생성하지 않는 *C. neoformans* var. *grubii* 또는 var. *neoformans*는 음성반응으로 변종을 확인하였다.

3. 균체 DNA 분리

C. neoformans 균체 DNA 분리는 Yamamoto방법을 응용하여 분리하였다(20). Brain Heart Infusion broth(BHI)에서 각 실험균주를 30℃, 48시간 배양한 후 원심분리하여 약 100μl pellet를 수집하여 100mM Tris-HCl buffer(TE pH8.0, 1mM EDTA)로 두 번 세척하였다. 각 검체에 250μl 100mM TE(pH9.0, 40mM EDTA), 50μl 10% sodium dodecyl sulfate와 200μl benzyl chloride를 가하여 혼합한 후 50℃ 에서 30분동안 가볍게 진탕하면서 방치한 다음 10000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 분리하였다. 상층액에 3M sodium acetate 50μl를 가한 후 0℃에서 10분간 방치하였다. DNA 침전물은 250μl isopropanol를 가하여 -70℃냉동고에서 1시간 방치하여 얻었으며. 침전된 DNA를 70% ethanol로 세척하여 건조한 후 40μl

10mM Tris-HCl buffer (TE pH8.0, 1mM EDTA)로 용해하여 사용하였다.

4. Mating type 분석

Mating type 분석은 Chaturvedi 법에 따라 *C. neoformans* 혈청형 A의 mating type alpha (*a*)와 **a**형의 특이 primer (Table 2)을 이용하여 PCR을 실시하였다(14). PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR premix kit (Bioneer Co. Korea)를 사용하여, DNA 시료(75ng) 1μl, primer (10pmol)를 각각 1 μl 넣고 증류수로 총 20μl 로 최종 부피를 맞추었다. PCR 반응 조건은 95℃에서 3분간 초기 반응, 94℃ 1분, 57.5℃ 1분, 72℃ 1분의 과정으로 30회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 7분 연장으로 PCR을 종결하였다. 증폭된 DNA 시료는 2% agarose gel을 통하여 전기영동을 실시하였고, 증폭산물의 크기에 따라 mating type, *MATa* (101bp) 또는 *MATa* (117bp)을 확인하였다.

Table 2. List of primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence(5'-3')	Reference
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	(15)
MAT _a F	CTTCACTGCCATCTTCACCA	(14)
MAT _a R	GACACAAAGGGTCATGGCCA	(14)
MAT _a F	CGCCTTCACTGCTACCTTCT	(14)
MAT _a R	CGCCTTCACTGCTACCTTCT	(14)
URA5 F	ATGTCCTCCCAAGCCCTC GACTCCG	(5)
URA5 R	TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC	(5)
OPH-02	TCGGACGTGA	(19)
OPH-12	ACGCGCATGT	(19)

5. Molecular type 분석

5.1. M13-PCR fingerprinting

M13 microsatellite 특이적 primer를 이용한 PCR fingerprint 분석은 Meyer법을 응용하여 실시하였다(13). PCR 반응 혼합액은 *AccuPower* PCR premix kit(Bioneer Co.)를 사용하여, DNA 시료(25ng) 1μl, M13 primer (Table 2) 10pmol를 1μl 넣고 증류수로 총 20μl로 최종부피를 맞추었다. PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 초기반응, 93℃ 20초, 50℃ 1분, 72℃ 20초의 과정으로 40회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 5분 연장으로 PCR을

종결하였다. 증폭된 DNA 시료는 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여, 증폭산물의 크기를 비교 확인하였다

5.2 *URA5* 유전자-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석

URA5 유전자-RFLP 분석은 *URA5* 유전자의 특이 primer (Table 2)를 사용하여 실시하였다(5). PCR 반응 혼합액은 *AccuPower* PCR premix kit (Bioneer Co.)를 사용하여, DNA 시료(75 ng) 1 μ l, 두 종류의 primer (10 pmol)를 각각 1 μ l 씩 넣고 증류수로 최종부피 20 μ l 를 맞추었다. PCR 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 초기반응, 94 $^{\circ}$ C 45초, 61 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 2분의 과정으로 35회 반복하였고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분 연장으로 PCR을 종결하였다. *URA5* 유전자 PCR 산물을 1.5% agarose gel상에서 확인한 후 gene clean kit (Bioneer Co.)를 사용하여 증폭된 600bp DNA를 분리하였다. RFLP 분석은 600 bp DNA PCR 산물에 2종류의 제한효소 *Sau* 96I과 *Hha*I (*BioLabs*, Ipswich, MA, USA)를 각각 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 반응시킨 후 2.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여, DNA 밴드 유형을 표준균주의 결과와 비교 확인하였다.

5.3 Random amplification of polymorphic DNA 분석(RAPD)

RAPD분석은 2종의 random primer, OPH-02와 OPH-12 (Table 2)를 사용하여 실시하였다 (19). PCR 반응 혼합액은 *AccuPower* PCR premix kit (Bioneer Co.)를 사용하여, DNA 시료(75 ng) 1 μ l, 한 종류의 primer (10 pmol)를 1 μ l 넣고 증류수로 최종부피 20 μ l를 맞추었다. PCR 반응조건은 94℃에서 4분간 초기반응, 92℃ 30초, 34℃ 1분, 72℃ 1분의 과정으로 35회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 5분 연장으로 PCR을 종결하였다. 증폭된 DNA시료는 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여, 증폭산물의 크기를 비교 확인하였다.

6. 자료분석 및 통계

모든 기술적인 자료는 평균±표준편차와 백분율(%)로 나타내었으며, 통계분석은 SPSS version 21 통계프로그램을 이용하였다.

III. 연구결과

1. *Cryptococcus neoformans* 혈청형 및 Mating type 확인

서울 및 부산 지역 2곳의 종합병원에서 2008년에서 2010년 동안 환자의 여러 종류의 가검물에서 분리 동정된 *C. neoformans* 30균주의 생화학적 성상을 재확인한 결과, 30주 모두 *C. neoformans*임을 확인하였다. .협막 다당체 항원성분의 혈청형(serotype) 분석결과에서는 모두 혈청형 A이었으며, 변종확인 생화학적 검사 결과에서 CGB 배지에서 음성을 나타냄으로서 임상균주 *C. neoformans*는 모두 *C. neoformans* var. *grubii* (혈청형 A)로 확인되었으며 *C. gattii* 균주는 검출되지 않았다.

C. neoformans 30주의 mating type을 MATa와 MATa 두 종류의 특이적 primer를 이용하여 PCR법을 실시한 결과 모두 101bp가 검출되어 MATa임을 확인하였다.

2. Molecular type

M13 primer에 의한 PCR fingerprinting의 결과는 Fig.1과 같다.

C. neoformans 4종류의 유전자형 표준균주(VNI, VNII, VNIII 및 VNIV)를 이용하여 임상균주 30주와의 결과를 분석한 결과, 임상균주 30주 모두는 표

준균주 VNI형과 동일한 패턴을 나타냄으로써 VNI 유전자형임을 확인하였다.

또한 *URA5* 유전자를 증폭하여 *Sau* 96I과 *Hha* I 제한효소를 이용하여 RFLP 분석한 결과 (Fig.2)에서 30주 모두 표준균주 VNI형과 동일한 밴드를 나타냄으로써 *C. neoformans* var. *grubii* VNI 유전자형임을 확인하였다.

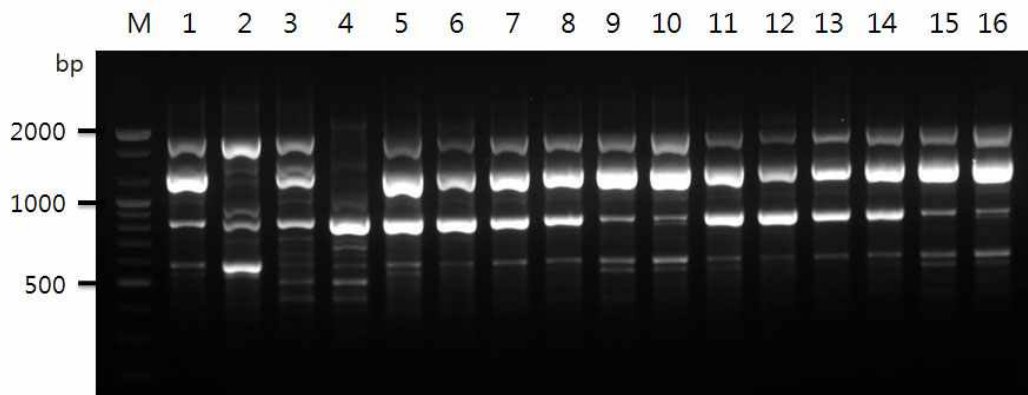


Figure 1. PCR-fingerprint profiles amplified with the primer M13.

Lane #1-#4, *C. neoformans* molecular type reference strains VNI, VNII, VNIII, and VNIV Lane #5-#12, selected clinical strains (sh98, sh99, sh100, sh107, sh108, sh109, sh110, sh111, sh104, sh105, sh106, and sh118) M, molecular marker (100 bp DNA ladder).

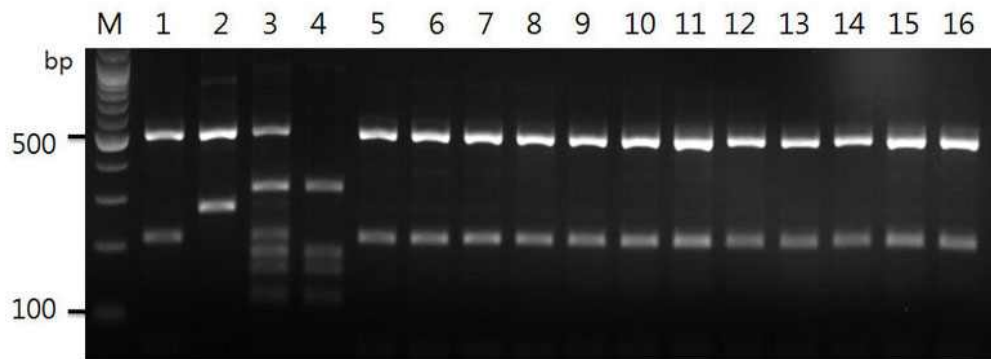


Figure 2. *URA5*-RFLP profiles identified after double digestion with the restriction enzymes *HhaI* and *Sau96I*.

Lane #1-#4, *C. neoformans* molecular type reference strains VNI, VNII, VNIII, and VNIV Lane #5-#12, selected clinical strains (sh98, sh99, sh100, sh107, sh108, sh109, sh110, sh111, sh104, sh105, sh106, and sh118); M, molecular marker (100 bp DNA ladder).

3. RAPD 분석

Random Primer 2종류, OPH-02와 OPH-12를 이용하여 RAPD 분석결과는 Fig.3과 같다. Primer OPH-02를 이용한 RAPD profile을 분석결과 (Fig.3A), 임상균주 간의 동일한 패턴으로 각 균주의 차이가 없었으며, Primer OPH-12를 이용한 결과에서도(Fig.3B) 균주 간에 동일한 패턴의 결과를 나타내었다. RAPD 결과에서 임상균주는 모두 동일한 양상을 나타냄으로써, 실험에 사용된 *C. neoformans*는 VNI 유전자형으로 subtype도 동일한 것임을 확인하였다.

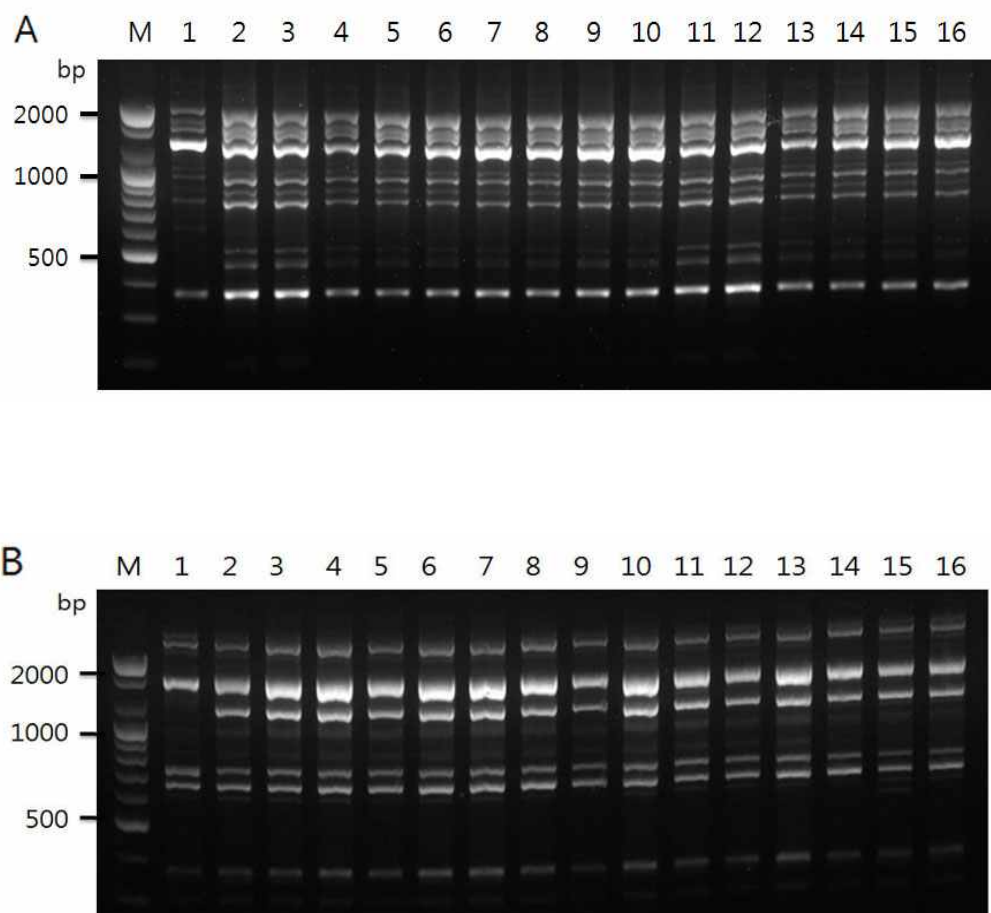


Figure 3. RAPD profiles amplified with the primer OPH-02 (A) and OPH-12 (B).

Lane #1, *C. neoformans* molecular type reference strains VNI Lane #2-#16, selected clinical strains (sh98, sh99, sh100, sh107, sh108, sh109, sh110, sh111, sh112, sh114, sh115, sh104, sh105, sh106, and sh118); M, molecular marker (100 bp DNA ladder).

4. Cryptococcosis 환자의 일반적 특성

2008년부터 2010년까지 3년 동안 *C. neoformans*가 분리된 환자는 총 30명이었으며 환자들의 평균연령은 62.7세이었다(Table 3). 총 30명중 여성이 17명(56.7%)이었으며 연도별 성비는 지속적으로 상승하였고 2009년에 분리율이 17명으로 상대적으로 높았다(Table 4).

Table 3. General characteristics of the patients with cryptococcosis

Baseline characteristics	
Total cases	30cases
Sex distribution-cases(%)	
Male	13(43.3%)
Female	17(56.7%)
Age(mean±SD ² ,range)(year)	62.7±12.4 (27-80)

Table 4. Incidence and Female distribution of Cryptococcosis during 2008-2010.

	2008	2009	2010	Total No.
Incidence	6	17	7	30
Female(%)	2(33.3%)	10(58.8%)	5(71.4%)	17(56.7%)

5. 기저질환과의 상관성

총 30명의 cryptococcosis환자 중에서 병력이 확인되지 않은 2명을 제외한 28명 환자에서 24명(80%)은 기저질환이 있었으며 나머지 4명은 기저질환이 없었다. 기저질환의 종류를 살펴보면 24명 중 악성종양 환자 수가 19명(79.1%)이었으며 이 중에서 간세포암 환자가 5명(20.8%)으로 가장 많았고 그 다음으로 폐암 환자가 3명(12.5%)을 차지하였다. 또한 HIV감염 환자가 3명(12.5%)이었다. 기저질환이 없는 환자 4명은 진균성 패혈증으로 나타났다 (Table 5).

Table 5. Underlying condition of the patients of cryptococcosis

Underlying Diseases	Frequency	Percent	Cumulative Percent
Hepatocellular carcinoma	5	20.8	20.8
HIV	3	12.5	33.3
Lung cancer	3	12.5	45.8
Tuberculosis	2	8.3	54.2
Non Hodgkin's Lymphoma	2	8.3	62.5
Myocardial Infarction	2	8.3	70.8
Leukemia	1	4.2	75.0
Spinal stenosis	1	4.2	79.2
Herpes Zoster	1	4.2	83.3
Endometrial cancer	1	4.2	87.5
Pancreatic cancer	1	4.2	91.7
Colon cancer	1	4.2	95.8
Purpura idiopathic thrombocytopenia	1	4.2	100.0
Total		100	

Frequency analysis, (IBM SPSS Statistics version 21. USA)

IV. 고 찰

Cryptococcosis는 AIDS환자를 비롯하여 면역기능이 현저히 떨어진 사람에게 기회적 감염으로 잘 알려져 있다(1,2). 최근에 *C. neoformans neoformans* 와 *C. gattii*으로 나누어지며, 이들 균종의 유전적 다양성으로 *C. neoformans* 에는 VNI-VNIV형, *C.gattii* 에는 VGI-VGIV형의 각각 4종류의 유전자형이 존재한다(20). 전 세계적으로 *C. neoformans*, VNI 유전자형, 혈청형 A균종이 면역기능저하 환자에서 주로 질병을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다(21). Meyer등은 *C. neoformans* 에 의한 감염증은 면역기능저하 환자에서 78.3%, 면역기능정상인 환자에서 21.7%로 발병되는 것으로 보고하였고, *C. neoformans* 감염증 중에서 *C. neoformans* VNI형, 혈청형A 균주가 면역기능 저하환자의 83.9%에서 발병되는 것으로 보고하였다(22).

*C. neoformans*와 이들 변종들로 인해 야기되는 임상질환과 지역적인 분포 사이에는 유의한 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있으며, 전세계적으로 많은 연구가 진행되고 있다(10,21). AIDS환자에서 *Cryptococcus* 감염의 원인균은 주로 *C. neoformans* var. *grubii*, 혈청형A으로 알려져 있으나, 브라질에서는 *C. neoformans* var. *grubii* 와 *C. gattii* 모두 원인균으로 보고되었다(23). 우리나라에서는 Hwang등은 1993년에서 2005년 사이 분리된 임상균주 51주와 환경균주 7주의 혈청형을 분석한 결과 혈청형 A가 55주, B 2주, D 1주이었으며, 환경균주는 모두 혈청형A로 보고한 바

있으며(24), Choi등은 1990년에서 2008년까지 우리나라에서 분리된 78주의 *C. neoformans*의 특성을 분석한 결과 75주는 *C. neoformans* 혈청형A, VNI형, 3주는 *C. gattii* 혈청형B 이었으며 그 유전자형은 VGII(2주)와 VGIII(1주)임을 보고하였다(25).

최근에 미생물의 분자유전학적 특성을 밝히기 위한 다양한 분석법이 소개됨으로써 *C. neoformans* 균종에 관한 분자유전학적 연구도 활발히 진행되고 있다. 지역적으로 이들 균종의 분자역학적 특성을 살펴보면 *C. neoformans* 혈청형 A, VNI형이 아시아, 아프리카, 그리고 센트랄 아메리카 지역에서 차지하는 비율은 각각 77%, 72.6% 및 78%로서 주종을 이루고 있으며, 유럽, 오세아니아, 북아메리카 지역에서는 VNI형이 각각 45%, 31%, 및 41%로서 상대적으로 분리율이 낮다. 유럽지역에서는 VNI형 대신에 VNIII와 VNIV형이 각각 26%와 20%을 차지하고 있어 *C. neoformans* 균종이 지역간의 큰 차이가 있음이 보고되었다(22). *C. gattii* 유전자형의 분리율을 살펴보면 아시아지역은 *C. gattii* VGI형이 15%로 주종을 이루며, 아프리카 지역에서는 VGIV형이 6%, 센트랄 아메리카 지역에서는 VGII형이 11%로 우위를 차지하고 있다. 오세아니아 지역에서는 VGI형이 43%, 북아메리카는 VGII형이 26%로 지역적 특성을 잘 나타내고 있다(22). 우리나라에서는 2012년 Hwang의 연구 보고에 의하면 1993년에서 2010년 동안 분리 동정된 임상균주 *C. neoformans* 125

균주 중에서 *C. gattii* 분리와 분자생물학적 특성을 분석한 결과 1993년, 1999년 및 2006년에 각각 1균주씩 총 3균주가 확인되었으며, 혈청형은 모두 B형이었고 유전자형은 각각 VGI, VGII 및 VGIII형을 나타내었다(26). Mihara 등은 일본 나가사키 지역에서 1996년에서 2010년 사이에 분리된 35주 임상 균주 *C. neoformans* 의 유전자형 분석을 한 결과에서 32주는 *C. neoformans* VNI형, 3주는 VNII형으로 분리됨을 보고하였다(27). 또한 Chen 등은 1980년에서 2006년까지 분리된 *C. neoformans* 129균주의 분자유전학적 특성을 분석한 결과 120주는 모두 *C. neoformans* 혈청형 A, VNI형이었으며, 9주는 *C. gattii* 혈청형 B, VGI형으로 보고하였다(4). 본 연구에서는 2008년에서 2010년 사이에 일부 종합병원에서 분리된 임상균주 30주를 이용하여 분자생물학적 특성을 살펴본 결과 모두 *C. neoformans* 혈청형 A, VNI형으로 확인되었으며, *C. gattii* 는 분리되지 않았다. 이와 같은 결과는 동아시아 지역인 일본과 중국에서 분리된 *C. neoformans* 균종의 유전자형 특성이 유사함을 확인하였으며 *C. gattii* 균종은 기후와 지역적 특성에 따라 우리나라를 비롯하여 온대지역 아시아 지역에서 아직은 그 분리율이 매우 저조함을 확인할 수 있었다. 그러나 지금까지 아열대 및 열대 기후조건과 자연서식처의 제한적 특성을 갖고 있던 *C. gattii* 균종이 북아메리카 온대 지역에서의 분리율 증가와 다양한 유전자형 출현은 전세계적으로 역학연구의 중요과제로 생각된다.

C. neoformans mating type은 *MATa* 와 *MATα* 두 종류가 존재하며 이 균종의 생태학적 특성과 병원성 관련 연구에 중요하다. 임상균주 또는 환경균주에 있어서 대부분이(~95%) *MATa* 로 주종을 이루며, mating type에 관계없이 적절한 환경에서 균사를 만들거나 눈으로 볼 수 있는 basidiospore를 형성하는 것으로 알려져 있다. 또한 mating type 결정 유전자는 잠재적 병원성 인자로서의 영향을 나타내는 것으로서, 동물실험 결과 *MATa* 균주가 *MATα* 균주 보다 병원성이 더 강한 것으로 보고되었다(13, 28). 기존의 연구와 본 실험의 결과에서 *C. neoformans* 임상균주는 모두 *MATa*형을 나타냄으로써 *MATa Cryptococcus* 균종이 우세함을 재확인하였다.

Cryptococcus 균종의 분자유전학적 분석방법으로 여러 가지 방법이 사용되고 있는데, 이중에서 M13 primer 및 (GACA) 반복서열에 의한 PCR fingerprint법, random amplification polymorphic DNA (RAPD)분석법, amplified fragment length polymorphism (AFLP), *URA5* 또는 phospholipase B (*PLB1*)유전자RFLP 분석법, multi-locus sequence typing (MLST)등 널리 이용되고 있다(29,30). 이중에서 M13 phage 특이 primer PCR-fingerprint법과 *URA5*유전자 RFLP분석법은 *C. neoformans* 유전자형을 확인할 수 있는 방법으로 잘 알려져 있다. Random primer을 이용한 RAPD 분석법은 *C. neoformans*의 분자유전학적 연구에 보다 손쉽게 응용할 수

있는 방법으로 유전자형의 subtype 결정, 변이 균종 출현, 임상균주와 환경균주 간의 상관성 등을 연구하는데 많은 도움이 되고 있다(5,19). 본 실험에서 2종류의 random primer, OPH-02와 OPH-12를 사용하여 RAPD 분석을 한 결과에서 임상균주 30주 모두 동일한 패턴으로, 균주 간의 차이가 없음을 확인하였다. Hwang은 2000년에서 2005년 사이 부산지역에서 분리된 임상균주 7주와 환경균주 5주의 *C. neoformans* 은 모두 혈청형A 이었으나, RAPD 분석 결과 두 종류의 다른 패턴이 확인되어 균종 간의 차이가 있음을 보고한 바 있다(19). Yamamoto 등은 나가사키 지역에서 분리된 *C. neoformans* 21주의 RAPD 분석 결과에서 4종류의 RAPD 패턴이 존재하는 것을 보고하였다(18). RAPD 분석법은 변이 균종의 유전적 특성을 쉽게 발견할 수 있는 방법으로 그 이용가치가 높은 실험이며 random primer의 선별과 지속적인 반복실험의 결과는 다양한 변이 균종을 확인하는데 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

C. neoformans 균종은 면역기능저하 환자에서의 기회 감염균이며 면역기능 정상인에서도 감염을 일으키는 병원성 진균이다. 장기이식, 후천성면역결핍증(AIDS) 등 면역기능저하 환자가 증가되면서 *Cryptococcus* 균종에 의한 기회감염 발생이 증가하였다(1,2). 최근에 AIDS환자에서의 cryptococcosis는 antiretrovirus 치료가 도입된 이후 점차 감소하고 있는 추세이나 개발도상국에서는 여전히 사망의 주원인이다(31). 그러나 인구의 고령화, 악성종양 관련

질환 증가에 따른 항암치료 등으로 비 HIV 감염에 의한 면역기능 저하 환자가 급증함에 따라 *Cryptococcus* 감염 환자가 증가하고 있다.

Cryptococcosis는 모든 연령대에서 발생 가능하며 평균적으로 30-50대에서 흔히 발견되는 것으로 알려져 있으며, 남성이 여성보다 우위를 차지하고 있다(31,32). 본 연구에서 총 30명 환자의 평균연령은 62.7세 이었으며, 여성이 17명(56.7%)으로 남성보다 높았다. Jeong등은 1995년부터 2008년 1월까지 서울지역 1개 대학병원에서 12년간 cryptococcosis 수막염이 발생한 33명 환자의 임상양상을 조사하여 보고한 연구결과에서 환자의 평균연령은 51.7세이었고, 남성이 61%임을 보고하였다(33). 또한 Choi등은 1990년부터 2008년까지 전국에서 분리된 임상균주 78주의 분자역학적 특성연구 결과에서 환자의 평균연령은 59.1세이었고, 남녀 성비에서 남성이 59.2%로 우위를 차지하였다(25). 2008년 이전까지 연구된 결과와 본 연구결과를 비교해 보면 cryptococcosis 환자의 평균연령이 51.7-59.1세에서 62.7세로 크게 증가되었음을 확인할 수 있었다. 또한 남녀 성비에서 기존의 연구 결과는 남성이 우위를 차지하였는데 비하여 본 연구결과에서는 여성이 평균 56.7%로, 연도별 상승하는 결과를 나타냄으로써 기존의 결과와 큰 차이점을 보였다. 이와 같은 결과는 인구 고령화에 따른 평균수명이 늘어난 결과에서 환자의 평균연령이 높아진 것으로 생각된다. Mihara등은 일본 나가사키 지역에서 1996년에서

2010년까지 비 HIV 감염 cryptococcosis 환자 35명의 임상기록에서 평균연령은 62.3세, 남성의 비율은 54.3%의 결과를 보고함으로서(27) 평균연령은 본 연구결과와 유사하였으나, 남녀성비의 차이가 있음을 확인하였다.

기존의 연구에 의하면 cryptococcosis 환자는 후천성면역결핍증이나 이식으로 인한 면역억제제 투여, 악성종양과 같은 면역기능저하의 원인이 되는 기저질환을 가지고 있는 것으로 보고하고 있다(1,32). Jeong등의 결과에 의하면 35명의 환자에서 76%가 기저질환을 가지고 있었으며, 장기이식환자와 면역억제제 투여 환자 수가 22명(66.6%)의 우위를 차지하고 있었으며, 간염 바이러스 보균자가 8명(24.2%)이었고, HIV감염환자는 3명(9.1%)이었다(27). Choi등의 결과에서는 병명이 확인된 62명에서 54명(85%)가 기저질환을 가지고 있었으며, 이 중 AIDS환자가 14명(25.9%)으로 가장 많았으며, 간질환 환자가 9명(16.7%)으로 그 다음순위를 차지하였다(25). 본 연구결과에서는 총 30명의 환자 중 24명(80%)이 기저질환을 가지고 있었으며, 간세포암 환자가 5명(20.8%)으로 가장 많았고 그 다음으로 폐암 환자가 3명(12.5%)을 차지하였다. 또한 AIDS 환자가 3명(12.5%)이었다. 이와 같은 결과에서 기저질환으로 간세포암이 우위를 차지한 것은 간기능의 저하가 *Cryptococcus* 감염의 중요한 위험인자로 작용할 수 있는 것으로 예측이 된다. 비록 3년이라는 짧은 기간 동안 수집된 자료였지만 Jeong등의 12년간의 후향적 연구에 비해서 분

리율이 상대적으로 높음을 보여주었으나 기존연구와는 달리 일관된 수집 방법을 사용하지 않은 제한점은 있었다. 2008년 이후 국내에서 발견된 *Cryptococcus*에 관한 연구가 아직 진행되지 않은 시점에서 본 연구는 2008년 이후의 보고라는 점에서 의미가 있으며 3년 동안 발견한 30명의 cryptococcosis 환자는 이전 연구결과들과 달리 여성이 남성보다 많았던 특이점이 있었고 평균연령이 10세 이상 상승한 것 또한 국내 고령화를 보여주고 있으며, 이전까지와는 달리 간질환 환자보다 간암환자들이 대다수 발견된 점 등을 통해서 기존연구들과의 차이점을 보여주고 있으므로 앞으로 *Cryptococcus* 감염역학에 대한 기초자료로서의 지속적인 연구의 필요성이 더 강조된다고 보여진다.

V. 결 론

2008년에서 2010년 사이에 서울 및 부산지역 일부 종합병원의 환자 30명에서 분리된 *C. neoformans* 분자생물학적 특성을 살펴본 결과 30균주 모두 *C. neoformans* var. *grubii* 혈청형 A, 유전자형 VNI형으로 균종간의 차이가 없는 동일한 균종임을 확인하였다. 환자들의 임상적 특성으로 성별, 평균나이 및 기저질환과의 상관성을 살펴 본 결과 여성이 남성보다 더 높은 비율을 나타내고 있으며, 평균연령이 62.7세로 기존의 연구와 차이점을 보였고 HIV

감염을 제외한 기저질환과의 상관성에서도 악성질환이 우위를 차지하고 있으며 특히 간세포암에서 분리율이 높음을 확인하였다.

참고문헌

- 1) Heiman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. Washington D. C. USA: ASM Press, 2011.
- 2) Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Baeza LC, Melhem Mde S, Medes-Giannini MJ. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007;49:41-7.
- 3) Liaw SJ, Wu HC, Hsueh PR. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. Clin Microbiol Infect 2010;16:696-703.
- 4) Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvintseva AP, Wollenberg KK, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. Emerg Infect Dis 2008;14:755-62.
- 5) Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis 2003;9:189-95.
- 6) Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Howard DH. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol 1977;105:582-6.

- 7) Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol 1990;28:1642-4.
- 8) Kuroki M, Phichaichumpon C, Yasuoka A, Chiranairadul P, Chosa T, Sirinirund P, *et al*. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* from an endemic region of HIV-associated cryptococcosis in Thailand. Yeast 2004;21:809-12.
- 9) Pappalardo MC, Melhem MS. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo.2003;45: 299-305.
- 10) Datta K, Bartlett KH, Marr KA. *Cryptococcus gattii*: emergence in western North America: exploitation of a novel ecological niche. Interdiscip Perspect Infect Dis 2009;2009:176532
- 11) Byrnes EJ 3rd, Li W, Ren P, Lewit Y, Voelz K, Fraser JA, *et al*. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. PLoS Pathog 2011;7:e1002205.
- 12) Feng X, Yao Z, Ren D, Liao W, Wu J. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. FEMS Yeast Res 2008;8:930-8.

- 13) Yan Z, Li X, Xu J. Geographic distribution of mating type alleles of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. J Clin Microbiol 2002;40:965-72.
- 14) Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan J, McClelland CM, Wickes BL, Chaturvedi V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT α pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. J Clin Microbiol 2000;38:2007-9.
- 15) Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. Electrophoresis 1999;20:1790-9.
- 16) Staib F. The green colour effect (GCE) of the killer strain *Cryptococcus laurentii* CBS 139 on Staib agar. Mycoses 1999;42:103-6.
- 17) Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved Diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). J Clin Microbiol 1982;15:535-7.

- 18) Yamamoto Y, Kohno S, Koga H, Kakeya H, Tomono K, Kaku M, *et al.* Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. J Clin Microbiol 1995;33:3328-32.
- 19) Hwang SM. Molecular characterization of clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans* isolated from Busan, Korea. J Bacteriol Virol 2010;40:91-8.
- 20) Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res 2006; 6:574-87.
- 21) Illnait-Zaragozi MT, Martínez-Machín GF, Fernández-Andreu CM, Boekhout T, Meis JF, Klaassen CH. Microsatellite typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates from Cuba shows multiple genetic lineages. PLoS One 2010;5:e9124.
- 22) Meyer W, Trilles, L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/*C.gattii* species complex. Australian biochemist 2010;41:12-5.
- 23) Ohkusu M, Tangonan N, Takeo K, Kishida E, Ohkubo M, Aoki S, *et al.* Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2002;44:299-302.

- 24) Hwang SM, Oh KS, Lee KW. Serotype and enzymatic profile of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Korea. Korean J Microbiol 2006;42:257-64.
- 25) Choi YH, Ngamskulrungroj P, Varma A, Sionov E, Hwang SM, Carriconde F, *et al.* Prevalence of the VN1c genotype of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV-associated cryptococcosis in the Republic of Korea. FEMS Yeast Res 2010;10:769-78.
- 26) Hwang SM. Molecular typing of clinical *Cryptococcus gattii* isolates in Korea. J Bacteriol Virol 2012;42:152-5.
- 27) Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungroj P, Umeyama T, Takazono T, *et al.* Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. Med Mycol 2013;51:252-60.
- 28) Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Distribution of α and α mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. Am J Epidemiol 1978;108:337-40.
- 29) Diaz MR, Boekhout T, Kiesling T, Fell JW. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res 2005;5:1129-40.

- 30) Brandt ME, Hutwagner LC, Kuykendall RJ, Pinner RW. Comparison of multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Cryptococcus neoformans*. The Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. J Clin Microbiol 1995;33:1890-5.
- 31) Mirza SA, Phelan M, Rimland D, Graviss E, Hamill R, Brandt ME, et.al . The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. Clin Infect Dis. 2003;36:789-94.
- 32) Chunag YM, Ho YC, Chang HT, Yu CJ, Yang PC, Hsueh PC. Disseminated cryptococcosis in HIV-uninfected patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27:307-10
- 33) Jeong SJ, Chae YT, Jin SJ, Baek JH, Chin BS, Han SH *et al*. Cryptococcal meningitis: 12 years experience in a single tertiary health care center. Infect Chemother 2010;42:285-90.

Abstract

Molecular Epidemiology of Clinical Strains of *Cryptococcus neoformans* Isolated from Korea

So Hae Park

Department of Public Health

The Graduate School of Public Health

Seoul National University

Cryptococcosis is generally caused by *Cryptococcus neoformans*, the opportunistic agent which has two species, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Both *C.neoformans*/*C.gattii* species contain a number of genetically diverse subgroups that can be differentiated by various molecular typing methods. We conducted a molecular epidemiological analysis of 30 clinical isolates of the *C.neoformans* from cryptococcosis patients who had been hospitalized between 2008 and 2010 in medical centers located in

Seoul and Busan in Korea. To determine the genetic diversity, 30 strains of *C.neoformans* were typed using PCR fingerprinting with the microsatellite specific primer of the phage M13 and the restriction fragment length polymorphism (RFLP) of orotidine monophosphosphate pyrophosphorylase (*URA5*) gene. All isolates were identified as serotype A, mating type *MATa* and molecular type VNI. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles obtained by using two primers revealed a single pattern. Our study shows that 30 strains of clinical *C.neoformans* are genetically homogeneous with all of the isolates were molecular type VN1, serotype A, mating type *MATa*.

Epidemiological characteristic of 30 strains isolated from patients diagnosed with cryptococcosis between 2008 and 2010 shows that there is relatively high isolation rate in the year of 2009(56.7%), and the mean age was 62.7. Among 30 patients, 17(56.7%) were female and annual female distribution was constantly increasing. Of the 30 patients, about 24(80%) had underlying diseases and the most common condition was HCC(20.8%) followed by lung cancer and HIV infection 3(12.5%) respectively.

This study demonstrates that the clinical features of cryptococcosis between 2008 and 2010 are different from the existing research results which report higher incidence of male patients. Because of an aging society, the mean age at the point of diagnosis was increased from 51.7, 59.1 to 62.7 years. Additionally cryptococcosis has been mostly diagnosed in non-HIV patients and the major predisposing factor was HCC.

Keywords : *Cryptococcus neoformans*, molecular type,
molecular epidemiology, underlying disease